

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000910

International filing date: 29 March 2005 (29.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0021216
Filing date: 29 March 2004 (29.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 17 May 2005 (17.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



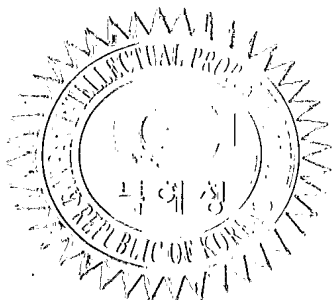
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2004-0021216
Application Number

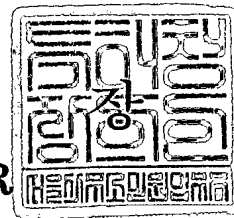
출원 년 월 일 : 2004년 03월 29일
Date of Application MAR 29, 2004

출원인 : 학교법인 포항공과대학교
Applicant(s) POSTECH FOUNDATION



2005 년 03 월 04 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.03.29
【발명의 명칭】	애기장대로부터 분리된 개화시기 조절 유전자 COG2
【발명의 영문명칭】	FLOWERING TIME-CONTROLLING GENE COG2 ISOLATED FROM ARABIDOPSIS THALIANA
【출원인】	
【명칭】	학교법인 포항공과대학교
【출원인코드】	2-1999-900096-8
【대리인】	
【성명】	오규환
【대리인코드】	9-1998-000435-1
【포괄위임등록번호】	2000-016245-0
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2000-016240-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	남홍길
【성명의 영문표기】	NAM,Hong Gil
【주민등록번호】	571220-1906022
【우편번호】	790-784
【주소】	경상북도 포항시 남구 효자동 산31 포항공과대학교 생명과 310호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김정식

【성명의 영문표기】 KIM, Jeong Sik

【주민등록번호】 780901-1558111

【우편번호】 790-784

【주소】 경상북도 포항시 남구 효자동 산31 포항공과대학교 생명과
310호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 박돈하

【성명의 영문표기】 PARK, Don Ha

【주민등록번호】 691004-1001610

【우편번호】

【주소】 미국, 오하이오주, 1060 카르막로드, 오하이오 주립대학,
식물생물공 학센터 랩038

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 임평옥

【성명의 영문표기】 LIM, Pyung Ok

【주민등록번호】 591222-2162519

【우편번호】 790-784

【주소】 경상북도 포항시 남구 효자동 산31 포항공과대학교 생명과
310호

【국적】 KR

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 6

【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대

리인

오규

환 (인) 대리인

장성구 (인)

【수수료】

【기본출원료】 22 면 38,000 원

【가산출원료】 0 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 0 항 0 원

【합계】 38,000 원

【감면사유】 학교

【감면후 수수료】 19,000 원

【요약서】**【요약】**

본 발명은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)로부터 분리된 개화시기 조절 유전자 COG2 및 이에 의해 코딩되는 단백질에 관한 것으로, 상기 유전자가 도입된 형질전환 식물체는 개화시기가 늦춰지는 효과를 나타내므로, 다른 개화시기 조절 유전자의 탐색 및 개화 관련 형질의 개선 등에 효과적으로 이용될 수 있다.

【대표도】

도 3

【명세서】

【발명의 명칭】

애기장대로부터 분리된 개화시기 조절 유전자 COG2{FLOWERING TIME-CONTROLLING GENE COG2 ISOLATED FROM ARABIDOPSIS THALIANA}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1a는 애기장대로부터 분리된 개화시기 조절 유전자 COG2 및 기존의 개화시기 조절 유전자 COG의 유전자 염기서열을 비교 분석한 것이고,
- <2> 도 1b는 애기장대로부터 분리된 개화시기 조절 유전자 COG2 및 기존의 개화시기 조절 유전자 COG에 의해 코드되는 단백질의 아미노산 서열을 비교한 결과를 나타낸 것이고,
- <3> 도 2는 애기장대로부터 분리된 개화시기 조절 유전자 COG2가 도입된 형질전환체 COG20X-9, COG20X-13 및 애기장대 야생형인 콜럼비아(Columbia)에서 COG2의 발현정도를 확인한 노던 블롯 분석 결과이고,
- <4> 도 3 은 장일조건 하에서 COG2 유전자가 도입된 형질전환체 COG20X-9, COG20X-13 및 콜럼비아의 개화시기 및 본잎 수를 조사한 것이고,
- <5> 도 4 는 단일조건 하에서 COG2 유전자가 도입된 형질전환체 COG20X-9, COG20X-13 및 콜럼비아의 개화시기 및 본잎 수를 조사한 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <6> 본 발명은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 분리된 개화시기 조절 유전자 COG2, 이에 의해 코드되는 단백질, 상기 유전자를 포함하는 발현벡터 및 상기 발현벡터에 의해 형질전환된 형질전환체에 관한 것이다.
- <7> 식물의 개화시기는 온도, 일장 또는 두 조건 모두에 따라 영향을 받을 수 있다. 일장에 따른 개화시기로 식물을 분류하면, 크게 장일 조건에서 개화하는 장일 식물, 단일 조건에서 개화하는 단일 식물 및 일장에 영향을 받지 않는 중일 식물로 나뉘며, 이러한 개화 특성은 여러 유전자에 의해 조절된다는 것이 보고되어 있다 (Yaron et al., *The Plant Cell*, Vol. 10, 1973-1989, 1998).
- <8> 농작물의 개화시기는 상품가치와 관련하여 중요한 의미를 가지므로 농업 분야에서는 개화시기를 결정하는 형질 조절 방법이 일찍부터 시행되어 왔다. 대표적인 방법으로 육종이 있는데, 고전적인 교배 육종법은 1 내지 2개의 특정 유전자만을 원하는 작물로 도입시키는 것이 불가능하던 시기에 교배 후 원하는 형질만 남을 때까지 반복 교배하여 필요 없는 형질들을 제거하던 방법으로 지금까지도 보편화되어 있다. 교배 육종은 보통 5년에서 20년 정도까지의 긴 시간과 노력이 요구되고, 이렇게 개발한 품종의 경우도 육종과정에서는 나타나지 않았던 내병성이나 다른 약세형질이 품종의 보급 후에서야 발견되는 문제점이 있다. 따라서 최근에는 개화시

기 관련 유전자들을 유전공학적으로 분리, 조작 및 도입하여 육종에 이용하는 방법이 연구되고 있고, 개화시기가 조절된 새로운 품종들이 만들어질 것으로 기대되고 있다(Ove Nilson et al., *Current Opinion in Biotechnology*, Vol 8, 195-199, 1997).

<9> 식물의 개화시기를 조절하는 방법은 상당히 복잡하며, 다양한 유전자의 상호 작용에 의해 이루어지는 것으로 보고되어 있다(Alon Samach et al., *BioEssays*, Vol. 22, 38-47, 2000).

<10> 최근에는 분자생물학적 기술을 통해 쌍떡잎식물의 모델종인 애기장대의 게놈 프로젝트가 완성되어 많은 유전자들의 염기서열이 공개 되었으며(*Arabidopsis genome initiative, Nature, 408, 796-815, 2000*), 이와 동시에 다른 모델시스템에서 얻은 염기서열과 비교 분석하여 30% 정도의 유전자 기능을 예측할 수 있게 되었다. 그러나, 이러한 결과는 유전자의 기능을 분자적인 수준에서 예측하는 데는 도움을 주지만, 실제 생물체 내에서 정확히 어떤 기능을 하는지에 대해서는 알 수 없는 문제점이 있다. 예를 들면, 게놈 프로젝트 결과로 애기장대의 많은 유전자가 유사 중복되어 있는 사실을 밝혀냈고, 실상 이러한 유전자들이 실제로는 다른 기능을 한다는 보고가 있다(Gualerti G, *Plant Cell, 14, 1253-63, 2002*). 따라서 기능이 알려진 유전자를 통해 아미노산 배열의 유사성을 갖는 유전자를 검색하고, 해당 유전자를 과발현시킨 형질전환체를 사용하여 유전자의 기능을 분석하는 것이 요구되고 있다.

<11> 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)는 장일조건에서 개화가 촉진되는 장일식물

로서 유전학적인 방법을 통하여 개화를 조절하는 세가지 경로가 존재함이

밝혀졌다. 일장의 길이에 관계없이 개화를 조절하는 자율 경로(autonomous pathway)에는 LD, PGM1, FY, FCA, FPA 및 FLD 등의 유전자가 관여하고, 일장의 길이를 감지하여 개화를 조절하는 광주기 경로(photoperiodic pathway)에는 ELF3, CAM1, GI, CO, FWA, FT 및 FE 등의 유전자가 관여하며, 온도에 따라 개화시기를 조절하는 춘화 경로(vernalization pathway)에는 VRN1, VRN2, FRI 및 FLC 등의 유전자가 관여한다.

<12> 애기장대는 다섯 개의 염색체에 대한 완전한 유전지도와 물리지도가 완성되어 있고, 최근 염색체의 염기서열 분석이 고등식물에서는 최초로 이루어져 분자생물학적 접근이 용이하다. 애기장대의 경우 어느 특정시기에 광주기와 같은 환경요인이나 내재적 요인에 의해 개화유도 신호가 생성되고 이 신호에 의해 영양생장기(vegetative growth)에서 생식 생장기(reproductive growth)로 상전이(phase transition)가 일어나 개화가 유도되므로, 생육조건에서 꽃대가 형성되어 꽃대의 길이가 약 1 내지 3 cm 가량 되었을 때(bolting time) 본잎의 수를 조사함으로써 개화시기의 지표로 삼을 수 있다. 또한, 애기장대는 아그로박테리움(Agrobacterium)을 이용하여 형질전환체를 쉽게 얻을 수 있어 목적유전자의 생물체 내 기능을 보다 정확히 알 수 있다는 장점이 있다.

<13> 이에 본 발명자들은 애기장대로부터 신규 개화시기 조절 유전자인 COG2를 발견하고, 이 유전자로 형질전환된 애기장대가 개화시기를 조절하는 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <14> 본 발명의 목적은 개화시기 조절 유전자 및 이에 의해 코드되는 단백질을 제공하는 것이다.
- <15> 본 발명의 다른 목적은 상기 개화시기 조절 유전자를 함유하는 발현 벡터 및 이 벡터로 형질전환된 식물체를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <16> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 애기장대에서 분리되고 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 개화시기 조절 단백질 COG2 및 상기 단백질을 코드하는 유전자를 제공한다.
- <17> 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 COG2 유전자를 포함하는 발현벡터 및 이에 의해 형질전환된 애기장대 형질 전환체 COG20X-9 또는 COG20X-13을 제공한다.
- <18> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <19> 애기장대로부터 분리된 본 발명의 개화시기 조절 유전자인 COG2는 513 bp로 이루어진 서열번호: 1의 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하며, 하나의 엑손(exon)만으로 구성되어 있다. 이는 NCBI에 등록된 전체 유전자 서열에 포함된 것과 일치한

다(<http://www.ncbi.nih.nlm.gov/entrez>).

<20> 그러나, 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 COG2 유전자를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 본 발명의 COG2 유전자는 코딩영역으로부터 발현되는 개화시기 조절 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함된다. 따라서, 본 발명은 서열번호: 1의 COG2 유전자와 실질적으로 동일한 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 및 상기 유전자의 단편을 역시 포함한다. 실질적으로 동일한 폴리뉴클레오티드란 서열번호: 2와 동일한 단백질 번역 생성물을 암호화하는 DNA로서 서열번호: 1과 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것들을 의미한다.

<21> 본 발명의 COG2 유전자에 의해 코드되는 단백질은 서열번호: 2에 나타난 바와 같은 170개의 아미노산으로 이루어져 있고, 분자량은 약 19 kDa이다. 이 단백질은 컴퓨터 구조예측 프로그램(PSORT; <http://psort.nibb.ac.jp/>)을 사용하여 분석한 결과, 핵에서 작용하는 단백질로 추정된다. 또한, 아미노산 염기서열 분석에 의해 상기 유전자가 해독되어 만들어지는 단백질은 식물의 전사 인자들(transcription factors)이 공유한다고 알려진 아미노산 서열인 DOF(DNA binding with One Finger) 도메인이 보존되어 있다. DOF 도메인을 포함하는 유전자들은 식물에서만 특이하게 존재하는 유전자 군으로서 세포 내에서 광합성관련 유전자의 활

성화, 종자 저장단백질 유전자의 활성화, 식물 암 유전자(plant oncogene)의 활성화, 식물 호르몬에 의해 유도되는 유전자의 활성화 및 스트레스 유도 유전자의 활성화 등 다양한 생리현상에 관여하는 전사 인자로 알려져 있다(Yanagisawa, *Trends in Plant Science*. 1, 213-214, 1996).

<22> 그러나, 상기 단백질의 아미노산 서열에서도 역시 단백질의 기능에 영향을 미치지 않는 범위내에서 아미노산의 치환, 부가 및/또는 결실이 이루어질 수 있으며, 목적에 따라 단백질의 일부만이 사용될 수도 있다. 그러한 변형된 아미노산 서열 및 이의 단편 역시 본 발명의 범위에 포함된다. 따라서, 본 발명의 범주에는 본 발명의 개화시기 조절 단백질로부터 유도된 단백질과 실질적으로 동일한 폴리펩티드 및 그의 단편을 역시 포함한다. 본원에서 사용되는 "실질적으로 동일한 폴리펩티드"란 서열번호: 2의 아미노산 서열과 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖는 폴리펩티드를 의미한다.

<23> 이러한 본 발명의 COG2 유전자 및 COG2 단백질은 식물의 개화관련 형질의 개선 및 타 식물체의 개화 조절 유전자의 탐색 등에 유용하게 이용될 수 있다. 본 발명의 유전자와 결합하는 물질, 상기 COG2 유전자의 발현을 억제 또는 활성화하는 물질을 탐색함으로써 식물의 개화 관련 유전자를 탐색하는 용도로 사용될 수도 있다. 구체적으로, 일반적으로 사용되는 DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응(PCR), 노던 블롯 분석, 서던 블롯 분석, 효소 면역 반응(ELISA) 및 2-D 겔 분석 등을 포함하는 다양한 방법으로 분석을 수행할 수 있다.

<24> 한편, 본 발명의 COG2 유전자 및 단백질은 애기장대에서 분리하거나, 콩지의

DNA 또는 펩타이드 합성 방법에 따라 합성할 수도 있다. 또한, 이렇게 제조된 유전자를 당 분야에 공지된 미생물 발현용 벡터에 삽입하여 발현벡터를 제조한 후 이를 아그로박테리움(Agrobacterium) 등의 적절한 숙주세포에 도입시킬 수 있다.

<25> 구체적으로, 본 발명에서는 COG2 유전자를 적절한 발현벡터, 예를 들어, pCAMBIA 3301 2원체 벡터(binary vector)에 삽입하여 발현벡터를 제조한 후, 이 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 미생물을 이용하여 애기장대 야생형을 형질전환시킴으로써 장일조건에서 개화지연 표현형을 나타내는 형질전환체 COG20X-9 및 COG20X-13을 제조하였다.

<26> 본 발명의 개화시기 조절 유전자 COG2를 함유하는 벡터에 의해 형질전환된 애기장대 COG20X-9 및 COG20X-13은 장일조건에서 애기장대 야생형인 콜럼비아(Columbia)에 비해 개화시기가 늦어지고, 개화시기에 본잎의 수가 많은 것으로 나타났다(도 3). 따라서, 본 발명의 개화시기 조절 유전자인 COG2 유전자는 애기장대를 포함하여 벼 등의 기타 장일성 식물의 개화시기를 조절하는 데 활용될 수 있다.

<27> 이를 위해, 본 발명에서는 COG2 유전자를 이용하여 식물체의 개화시기를 조절하는 방법을 제공한다. 즉, COG2 유전자를 함유하는 발현벡터로 식물체를 형질전환시켜 COG2 유전자를 과발현시킴으로써 식물체의 개화시기를 지연시킬 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 개화가 조절될 수 있는 식물로는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리, 수수를 포함하는 식량작물류; 아라비도시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근을 포함하는 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채를 포

함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스 등을 포함하는 사료작물류가 모두 이용될 수 있으며, 특히 본 발명의 방법을 상추나 시금치와 같이 개화시기 후 엽류의 급속한 노화가 일어나 상품가치가 급속히 떨어지는 엽채류 식물 등에 적용할 경우, 경제적으로 활용가치가 크다.

<28> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<29> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<30> 실시예 1: 애기장대로부터 개화시기 조절유전자 COG2의 분리 및 염기서열 확인

<31> CTAB(Cethyltrimethylammonium bromide, sigma, USA)을 사용하여 애기장대의 게놈 DNA를 분리하였다. 분리된 애기장대 게놈 DNA로부터 개화시기 조절 유전자 COG 유전자의 염기 서열(국제출원공개 제 WO 03/018628호)을 이용하여 NCBI 데이터베이스(<http://www.ncbi.nlm.gov/blast/>)를 통해 COG 유전자의 염기서열과 유사한 염기서열을 가진 유전자를 검색하였다.

<32> 다음과 같은 반응을 수행하여 애기장대 게놈 DNA로부터 상기 검색된 유전자

를 분리하였다. 즉, 애기장대의 게놈 DNA 10 ng에 이엑스택(ExTaq, Takara, JP) 중합효소 20 pmol, *Nco*I 인지부위를 갖도록 고안 합성된 서열번호: 3의 정방향 프라이머(forward primer) 20 pmol, *Bst*EII 인지부위를 갖도록 고안 합성된 서열번호: 4의 역방향 프라이머(reverse primer) 20 pmol 및 dNTP 2.5 mM를 가하고 진엠프 9600(GeneAmp 9600, PerkinElmer)을 사용하여 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 수행하였다. PCR은 95℃에서 3분 동안 변성시키고, 각 회마다 94℃에서 15초, 53℃에서 30초 및 72℃에서 50초로 35회의 사이클(cycle)을 수행하였으며, 72℃에서 7분 동안 가열하여 반응을 종료하였다. PCR로 증폭된 유전자를 1% 아가로스 겔에서 100 V로 1시간 동안 전기영동한 다음, 유전자 밴드를 잘라내어 겔 용출 키트(gel elution kit, Quiagen)를 이용하여 COG2 유전자를 용출하였다. 이어서, GEM T 이지 벡터 키트(GEM T easy vector kit, Promega)를 사용하여 T 벡터에 서브클로닝(subcloning)하였다.

<33> 상기 클로닝된 유전자의 염기서열을 분석하였고, 이 유전자는 서열번호: 1의 염기서열을 가지며, 이에 의해 코딩되는 단백질은 트랜슬레이션 툴(Translation tool: <http://tw.expasy.org/tools/dna.html>)을 사용하여 분석한 결과 서열번호: 2의 아미노산 서열을 코딩하는 것을 확인하였다. 또한, 이 유전자 및 이에 의해 코딩되는 단백질과 기존에 알려진 개화시기 조절 유전자 COG 및 이에 의해 코딩되는 단백질의 염기서열 및 아미노산 서열을 각각 비교하였다.

<34> 그 결과, 도 1a에서 나타낸 바와 같이 서열번호: 1의 염기서열을 갖는 유전자는 COG 유전자와 염기서열 상에서 78%의 상동성을 나타내었으며, 도 1b에 나타낸

바와 같이 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질은 COG 단백질과 아미노산 서열상에서 77%의 상동성과 82%의 유사성을 나타내었다. 본 발명에서는 애기장대로부터 분리된 본 유전자를 "COG2 유전자"라 명명하였다. 본 발명의 COG2 단백질은 170개의 아미노산으로 구성되며 분자량은 19 kDa이고, 컴퓨터 구조예측 프로그램 (PSORT; <http://psort.nibb.ac.jp/>) 상에서 핵 내에 존재하는 아미노산 서열이 존재함을 알아냈다. 즉, COG2 단백질은 COG와 유사하게 핵에서 작용하는 단백질인 것으로 예측된다. 또한, COG2 단백질은 DOF(DNA binding with One Finger) 도메인으로 알려져 있는 전사 인자(transcription factors)들이 공유하는 아미노산 서열이 보존되어 있음을 확인하였다(서열번호: 2의 아미노산 60 내지 110).

<35> 실시예 2: COG2 유전자를 포함하는 발현벡터 및 형질전환체의 제조

<36> 실시예 1에서 제조된 T 벡터에 클로닝된 COG2 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 2원체 벡터(binary vectors)인 pCAMBIA 3301 벡터(Cambia, USA)를 각각 2 μ l (10 단위/ μ l)의 제한효소 *Nco*I 및 *Bst*EII로 37°C에서 4시간 동안 처리한 후, 겔 용출 키트를 이용하여 COG2 유전자를 포함하는 0.54 kb의 DNA 단편과 9.26 kb의 pCAMBIA 3301 벡터의 *Nco*I/*Bst*EII 단편을 용출한 다음, T4 리가제(T4 ligase, Roche)를 1 μ l(1 ug/ μ l) 처리하여 16°C에서 6시간 동안 반응시켰다. 이렇게 클로닝된 COG2를 포함하는 벡터를 전기 충격을 이용하여 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* ABI strain, 미국 Amasino 실험실)에 도입하여 형질전환시켰다. 이 형질전환 미생물을 이용하여 플로랄 디핑 방법(floral dipping methods; Clough *et*

al., *Plant J.*, 16(6):735-743)에 따라 애기장대 야생형인 콜롬비아(Columbia, Arabidopsis stock center, USA)를 형질전환시켰다. 형질전환된 애기장대로부터 종자를 받은 후, 16낮/8밤의 인공환경 배양실에 15×15 cm 포트 10개에 1×10^5 개의 씨앗을 뿌린 다음, 0.03% 바스타(basta, 한국) 제초제를 처리하여 살아남은 형질전환체를 선발하였으며, 육안으로 개화시기를 관찰한 결과, COG2 형질전환체들은 정도의 차이는 있지만 모두 장일 조건에서 개화지연 표현형을 보이는 것을 확인하였다. 이들 형질전환체 중에서 개화시기가 가장 늦어지는 두개의 형질전환체를 선발하여, 각각 형질전환체 COG20X-9 및 COG20X-13으로 명명하였다.

<37> 실시예 3 : 노던 블롯을 이용한 형질전환체의 COG2 유전자 발현 확인

<38> COG2 유전자가 실제로 형질전환체 내에서 과발현되는지를 확인하기 위하여 노던 블롯 분석 방법을 통해 형질전환체의 COG2 유전자 발현을 조사하였다.

<39> 애기장대 야생형인 콜롬비아 및 실시예 2에서 제조한 형질전환체 COG20X-9 및 COG20X-13의 조직을 분쇄하여 전체 RNA를 트리-시약 키트(Tri-Reagent Kit, molecular research center, USA)로 추출하였다. 추출한 각 RNA 30 μ g을 1.2% 포름알데하이드-아가로스 겔(formaldehyde-agarose gel) 상에서 분리하였고, 분리한 RNA를 진공 수송 시스템(vacuum transport system, USA)을 사용하여 나일론 막(nylon membrane, Hybond N⁺, Amersham사, USA)으로 옮겼다. 나일론 막을 UV-크로스링커(UV-crosslinker, Stratagene사)에서 자외선에 노출시킨 후, 65℃에서 1시간

동안 건조하였다. 건조된 나일론 막을 방사능 표지된 프로브(radio-labeled probes)로 처리한 다음 처치 앤 길버트 용액(Church and Gilbert solution; 25 mM sodium phosphate, 1 mM EDTA, 7% SDS, 1% BSA)을 사용하여 65℃에서 16시간 동안 혼성화(hybridization) 반응을 수행하였다. 이때 프로브로는, COG2 유전자의 경우 실시예 1에서 클로닝된 T 벡터를 *EcoRI*으로 절단하여 COG2 유전자를 용출한 후 랜덤 프라이밍 키트(random priming kit, Amersham pharmcia, USA)과 5 μ l dCTP(1 mCi/ μ l, Amersham pharmcia)를 사용하여 제조회사의 사용법에 따라 방사능을 표지하여 사용하였으며, COG2의 발현량을 비교하기 위한 비교 유전자로서 액틴유전자인 ACT8의 경우 서열번호: 5의 정방향 프라이머와 서열번호: 6의 역방향 프라이머를 이용하여 실시예 1에서 제시한 PCR 방법에 따라 증폭시킨 DNA 산물을 상기와 같은 방법으로 방사능 표지하여 사용하였다. 상기 혼성화 반응 후, 나일론 막을 65℃에서 2×SSC 및 0.2% SDS 조성의 세척액으로 10분 동안 세척한 다음 1×SSC 및 0.1% SDS 조성의 세척액으로 10분 동안 세척하였으며, 마지막으로 0.1×SSC 및 0.1% SDS 조성의 세척액으로 세척하였다. 세척한 나일론 막은 BAS 필름에 이를 노출 시킨뒤, phosphorimager(BAS2000, Fuji, Japan)를 사용하여 분석하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

<40>

도 2에서 보는 바와 같이, 콜럼비아에서는 COG2의 mRNA 발현이 극히 낮거나 거의 없는데 비하여 형질 전환체 COG20X-9 및 COG20X-13 모두에서는 COG2의 mRNA 발현이 상당히 높음을 확인하였으며, 특히 형질전환체 COG20X-9에서는 COG20X-13에 비해 COG2의 mRNA 발현이 훨씬 높았다.

<41> 실시예 4: 콜럼비아 및 형질전환된 애기장대의 개화시기 조절효과 비교

<42> 형질전환체 COG20X-9 및 COG20X-13에서 야생종 애기장대에 비해 개화시기가 얼마나 늦어지는지를 알아보기 위해 유전자형이 일정한 호모 라인을 선발하였다. 콜럼비아 야생종(Columbia; Arabidopsis stock center, USA)과 두 형질전환체의 종자를 4℃에서 암처리상태로 약 3 내지 5일간 물에 담가 두어, 실험에 사용되는 모든 종자의 발아 시기가 동일하도록 유도하였다. 상기 각 종자들을 화분에 일정한 간격으로 파종한 후 약 7일간 종자의 발아를 돕기 위해 화분에 랩을 씌워 다습한 상태로 유지시켰다. 종자가 발아하면 화분을 16시간 낮/8시간 밤의 장일 조건 및 8시간 낮/16시간 밤의 단일조건으로 각각 옮기고, 발아시기로부터 개화시기까지의 일수와 꽃대가 약 3 cm정도 자랐을 때의 본잎의 수를 기록하였다.

<43> 도 3 및 도 4는 각각 장일 및 단일 조건에서의 콜럼비아와 형질전환체의 개화시기를 비교하여 나타낸 것이다. 도 3에서 보는바와 같이, 장일조건에서 콜럼비아는 22.5일에 꽃이 피는데 비해 형질전환체 COG20X-9 및 형질전환체 COG20X-13은 각각 44일 및 38일에 꽃대가 올라오는 것을 확인하였다. 또한 형질전환체 COG20X-9 및 COG20X-13은 각 개화시기 경의 본잎 수에 있어서도 콜럼비아보다 많은 것으로 보아, 형질전환체의 경우 만추개화하는 것을 알 수 있다. 한편, 도 4에서 보는 바와 같이, 단일조건에서는 장일조건과 달리 형질전환체 COG20X-9의 개화시기 및 잎 수 모두 콜럼비아와 유사함을 알 수 있다.

【발명의 효과】

<44>

애기장대로부터 분리된 본 발명의 개화시기 조절 유전자 COG2 및 이에 의해 코드되는 COG2 단백질은 장일조건에서 식물의 개화시기를 조절할 수 있을 뿐만 아니라 개화시기가 조절된 새로운 농작물 종자의 개발이나 다른 개화시기 조절 유전자의 탐색 등에 효과적으로 이용될 수 있다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는, 애기장대의 개화시기 조절 단백질 COG2.

【청구항 2】

제 1 항의 단백질을 코드하는 DNA.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서,

서열번호: 1의 염기서열을 갖는 DNA.

【청구항 4】

제 2 항의 DNA를 포함하는 발현벡터.

【청구항 5】

제 4 항의 발현벡터에 의해 형질전환된 미생물.

【청구항 6】

제 4 항의 발현벡터에 의해 형질전환된 식물체.

【청구항 7】

제 2 항의 DNA를 이용하여 식물체의 개화시기를 조절하는 방법.

【청구항 8】

제 7 항에 있어서,

제 2 항의 DNA를 포함하는 발현벡터로 식물체를 형질전환시켜 COG2 유전자를 과발현시킴으로써 식물체의 개화시기를 지연시키는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 9】

제 8 항에 있어서,

식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리, 수수를 포함하는 식량작물류; 아라비도시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근을 포함하는 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩, 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

COG2 유전자 또는 COG2 단백질을 이용하여 식물의 개화 조절 유전자 또는 단백질을 탐색하는 방법.

【청구항 11】

제 10 항에 있어서,

DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응(PCR), 노던 블롯 분석, 서던 블롯 분석, 효소 면역 반응(ELISA), 2-D 겔 분석을 포함하는 방법에 의해 유전자의 서열 상동성,

혼성화 반응 또는 단백질의 결합 반응을 조사하는 것을 특징으로 하는, 식물의 개화 조절 유전자 또는 단백질을 탐색하는 방법.

【도면】

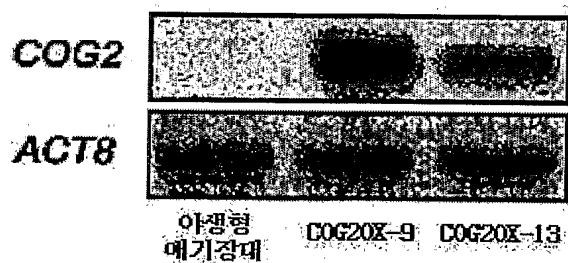
【도 1a】

COG2	1	10	20	30	40	50	60	
COG	1	ATGCGCAGCC	AAGATTCTCA	AGGGATTAAA	CTCTTIGSCA	AACCTATGCG	ATT-----	53
		ATGCGCAGCC	AAGATTCTCA	AGGGATTAAA	CTCTTIGSCA	AAACCATTAAC	ATTCAACGCC	54
COG2	54	70	80	90	100	110	120	
COG	54	TA--A--GAGTC	GAACATATAA	AAATGAAGT-	-AGAG--AC	-AGACCTGGC	GAAGCAGGAA	105
	61	AACATCACAC	AGACCATAAA	AAACAAGAC	CAGCAACAC	AACACAGCC	AGACCTGCA	120
COG2	116	130	140	150	160	170	180	
COG	121	GCCACAAATAG	CCGTTAGATC	AICATCAICA	TCGCAICTGA	CGGCCGAGAA	CCGTCCGGAT	165
		GCCACAAATAG	CCGTTAG---	AICATCCICA	TCGCAICTGA	CGGCTGAGAA	CCGTCCGGAT	170
COG2	166	190	200	210	220	230	240	
COG	178	AAGATCATAC	CATGTCCGAG	AICCAAGACU	ATCGAGACAA	AGTTCCTGTTA	CTTCAACAA	225
		AAGATCATAC	CATGTCCGAG	AICCAAGAC	ATCGAGACAA	AGTTCCTGTTA	CTTCAACAA	227
COG2	225	250	260	270	280	290	300	
COG	258	TACAACTTTA	ATCAACCTTC	ACACITCTGC	AAAGGCTGTC	ACGCTTACTG	GAACGCGCGT	285
		TACAACTTTA	ATCAACCTTC	ACACITCTGC	AAAGGCTGTC	ACGCTTACTG	GAACGCGCGT	297
COG2	286	310	320	330	340	350	360	
COG	290	GGTGGACTCC	GGAACTTTC	GCTCGAGGCC	GATCGTCGGA	AGTCGAAAC	AGCTAGTCTG	345
		GGTGGACTCC	GGAACTTTC	GCTCGAGGCC	GATCGTCGGA	AGTCGAAAC	AGCTAGTCTG	357
COG2	346	370	380	390	400	410	420	
COG	358	GTCGCTGGGT	TCCTGAGCTA	GCTTGGAGAT	GGAATGAG	TGTTCCGCGA	AGTCGAGCTT	396
		GTCGCTGGGT	TCCTGAGCTA	GCTTGGAGAT	GGAATGAG	TGTTCCGCGA	AGTCGAGCTT	415
COG2	407	430	440	450	460	470	480	
COG	415	ATBAATGCGT	TCCTCGTGA	CGAGTGGGAG	CACTCCCGAG	CGTGAAGTCA	CGCTACTTTC	456
		ATBAATGCGT	TCCTCGTGA	AGAGTGGGAG	---AGCTGGA	CGCTGCTGCA	CGCTGCTTTC	471
COG2	457	490	500	510	520	530	540	
COG	472	CGGCTGCTTT	TTCCCTGCA	CGGCTGCTTC	TTTACCTCG	TCGCTGCTTC	---CTG-CTTC	513
		CGGCTGCTTT	TTCCCTGCA	CGGCTGCTTC	TTTACCTCG	TCGCTGCTTC	TTGTTAATTA	527
COG2	513	513						
COG	527	TTT	525					

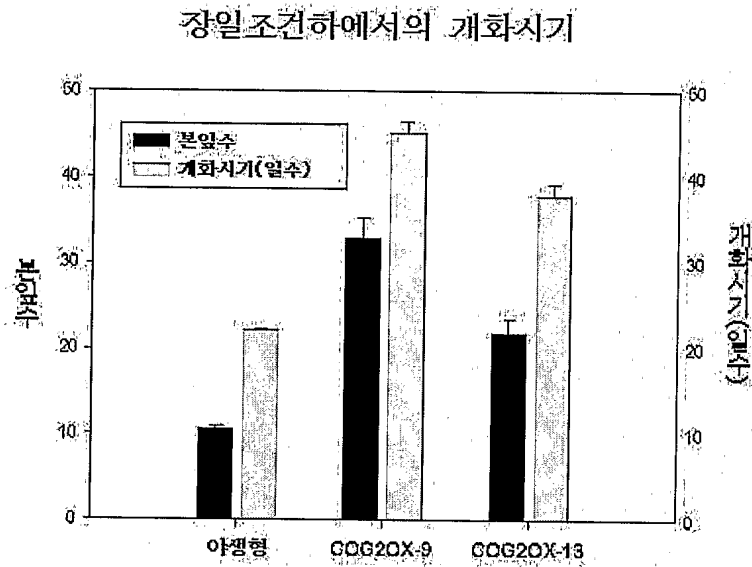
【도 1b】

		10	20	30	40	50	
COG2	1	MATQDSQGIH	LEKRIIAE	NITRIKNEE	ETHEPEQE	ATTAVRSSSS	45
COG	1	MATQDSQGIH	LEKRIIEENA	NITRIKNEE	QQQQQCDELQ	ATTAVR-SBS	49
		60	70	80	90	100	
COG2	46	SDLTAEKKEPD	KIITCDRCKS	METKFCYENN	INVNQDRHFC	KSCRYWTAG	95
COG	50	SDLTAEKKEPD	KIITCDRCKS	METKFCYENN	INVNQDRHFC	KSCRYWTAG	99
		110	120	130	140	150	
COG2	96	SALRNVEVGA	GRKSKDEGFA	WVGMLED	GNGVRQVEL	INCLIVEEWQ	142
COG	100	SALRNVEVGA	GRKSKDEGFA	VGGFAELLEFA	ATGAVDQVEL	SALLIVEEWS	148
		160	170	180			
COG2	143	HAAAAAHGSE	RHDFPMKRLR	CYSDGQSC			170
COG	148	-AATAHSGSE	RHDFPMKRLR	CYTDGQSCDE			177

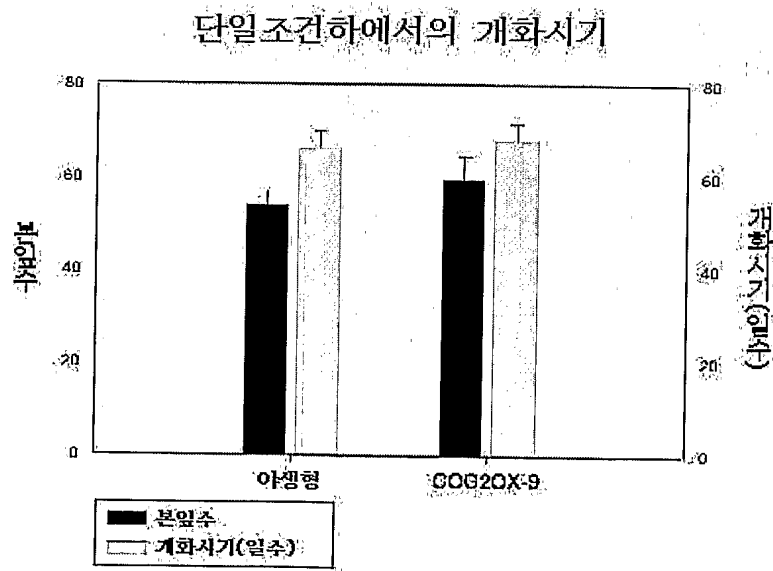
【도 2】



【도 3】



【도 4】



【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부

